



MORGAN L. FITCH, JR.
FRANCIS A. EVEN*
JULIUS TABIN
JOHN F. FLANNERY
ROBERT B. JONES
JAMES J. SCHUMANN
JAMES J. HAMILL
TIMOTHY E. LEVSTIK
JOSEPH E. SHIPLEY
KENNETH H. SAMPLES
PHILIP T. PETTI
JOSEPH T. NABOR
STEVEN C. SCHROER
RICHARD A. KABA*
KARL R. FINK
MARK W. HETZLER
TIMOTHY P. MALONEY
JAMES P. KRUEGER
STEPHEN S. FAVAKEH
EDWARD W. GRAY, JR.*
RICHARD E. WAWRZYNIAK
STEVEN G. PARMELEE
SHERRI N. BLOUNT*
BRUCE R. MANSFIELD
KENDREW H. COLTON*
G. PAUL EDGELL*
RICHARD W. SCHUMACHER
MICHAEL A. SANZO*

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

ATTORNEYS AND COUNSELLORS AT LAW

Established in 1859

SUITE 401L - 1801 K STREET, NW
WASHINGTON, D.C. 20006-1201

TELEPHONE (202) 419-7000

FACSIMILE (202) 419-7007

ILLINOIS OFFICE

SUITE 1600 - 120 SOUTH LA SALLE STREET, CHICAGO, ILLINOIS 60603-3406

TELEPHONE (312) 577-7000

CALIFORNIA OFFICE

SUITE 250 - 9276 SCRANTON ROAD, SAN DIEGO, CA 92121-7707

TELEPHONE (858) 552-1311

COLORADO OFFICE

SUITE 213 - 1942 BROADWAY, BOULDER, COLORADO 80302

TELEPHONE (303) 402-6966

CHRISTOPHER E. GEORGE*
SCOTT J. MENGHINI
EDWARD E. CLAIR
SANDRA V. SCAVO
JON A. BIRMINGHAM
RUDY KRATZ
RAMON R. HOCH*
JOHN E. LYHUS
STEVEN M. FREELAND
DONNA E. BECKER
SEAN R. O'DOWD
MICHAEL G. VRANICAR
BRIAN S. CLISE
MARTIN R. BADER
DEREK L. PRESTIN
MARK A. BORSOS
DAVID R. JAGLOWSKI
W. BRIAN EDGE*

PATENT AGENTS

ERIC J. WHITESSELL
JONATHAN H. BACKENSTOSE
LILIA I. SAFONOV

OF COUNSEL

THOMAS F. LEBENS
GEORGE W. SPELLMIRE, JR.
LISA M. SOMMER

March 11, 2004

Commissioner of Patents
U.S. Patent and Trademark Office
2011 South Clark Place
Customer Window
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03
Arlington, VA 22202

Re: Submission of Priority Document
Appl. No.: 10/784,902
Filed: February 24, 2004
Title: **Process for the Preparation of
L-Amino Acids Using Strains of the
Enterobacteriaceae Family**
Inventor(s): Rieping, Mechthild
Atty. Dkt.: 7601/80981

Dear Sir:

The following documents are being forwarded for appropriate action by the U.S. Patent and Trademark Office:

1. Submission of Priority Document in Accordance with the Requirements of Rule 55 with certified copy of DE 10 2004 003 411.7 attached; and
2. Return postcard.

*ADMITTED TO D.C. BAR; D.C. PRACTICE OF
ALL OTHERS LIMITED TO FEDERAL COURTS
AND AGENCIES

Commissioner of Patents
March 11, 2004
Page 2

Applicant does not believe that any fee is due for the filing of these documents. However, the Commissioner is hereby authorized to charge any fee deficiency with respect to this filing and any other fee required in connection with the present case, or credit any overpayment, to our Deposit Account No. 06-1135 under Order No. 7601/80981.

It is respectfully requested that the enclosed postcard be stamped with the date the enclosed documents are received by the PTO and that it be returned as soon as possible.

Very truly yours,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

A handwritten signature in black ink, reading "Michael A. Sanzo". The signature is written in a cursive, flowing style.

Michael A. Sanzo
Reg. No. 36,912
Attorney for Applicant

MAS:ct
Enclosures



MORGAN L. FITCH,
FRANCIS A. EVEN*,
JULIUS TABIN
JOHN F. FLANNERY
ROBERT B. JONES
JAMES J. SCHUMANN
JAMES J. HAMILL
TIMOTHY E. LEVSTIK
JOSEPH E. SHIPLEY
KENNETH H. SAMPLES
PHILIP T. PETTI
JOSEPH T. NABOR
STEVEN C. SCHROER
RICHARD A. KABA*
KARL R. FINK
MARK W. HETZLER
TIMOTHY P. MALONEY
JAMES P. KRUEGER
STEPHEN S. FAVAKEH
EDWARD W. GRAY, JR.*
RICHARD E. WAWRZYNIAK
STEVEN G. PARMELEE
SHERRI N. BLOUNT*
BRUCE R. MANSFIELD
KENDREW H. COLTON*
G. PAUL EDGELL*
RICHARD W. SCHUMACHER
MICHAEL A. SANZO*

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

ATTORNEYS AND COUNSELLORS AT LAW

Established in 1859

SUITE 401L - 1801 K STREET, NW
WASHINGTON, D.C. 20006-1201

TELEPHONE (202) 419-7000

FACSIMILE (202) 419-7007

ILLINOIS OFFICE

SUITE 1600 - 120 SOUTH LASALLE STREET, CHICAGO, ILLINOIS 60603-3406
TELEPHONE (312) 577-7000

CALIFORNIA OFFICE

SUITE 250 - 9276 SCRANTON ROAD, SAN DIEGO, CA 92121-7707
TELEPHONE (858) 552-1311

COLORADO OFFICE

SUITE 213 - 1942 BROADWAY, BOULDER, COLORADO 80302
TELEPHONE (303) 402-6966

CHRISTOPHER E. GEORGE*
SCOTT J. MENGHINI
EDWARD E. CLAIR
SANDRA V. SCAVO
JON A. BIRMINGHAM,
RUDY KRATZ
RAMON R. HOCH*
JOHN E. LYHUS
STEVEN M. FREELAND
DONNA E. BECKER
SEAN R. O'DOWD
MICHAEL G. VRANICAR
BRIAN S. CLISE
MARTIN R. BADER
DEREK L. PRESTIN
MARK A. BORSOS
DAVID R. JAGLOWSKI
W. BRIAN EDGE*

PATENT AGENTS

ERIC J. WHITESELL
JONATHAN H. BACKENSTOSE
LILIA I. SAFONOV

OF COUNSEL

THOMAS F. LEBENS
GEORGE W. SPELLMIRE, JR.
LISA M. SOMMER

March 11, 2004

Commissioner of Patents
U.S. Patent and Trademark Office
2011 South Clark Place
Customer Window
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03
Arlington, VA 22202

Re: Submission of Priority Document
Appl. No.: 10/784,902
Filed: February 24, 2004
Title: **Process for the Preparation of
L-Amino Acids Using Strains of the
Enterobacteriaceae Family**
Inventor(s): Rieping, Mechthild
Atty. Dkt.: 7601/80981

Dear Sir:

The following documents are being forwarded for appropriate action by the U.S. Patent and Trademark Office:

1. Submission of Priority Document in Accordance with the Requirements of Rule 55 with certified copy of DE 10 2004 003 411.7 attached; and
2. Return postcard.

*ADMITTED TO D.C. BAR; D.C. PRACTICE OF
ALL OTHERS LIMITED TO FEDERAL COURTS
AND AGENCIES

Commissioner of Patents
March 11, 2004
Page 2

Applicant does not believe that any fee is due for the filing of these documents. However, the Commissioner is hereby authorized to charge any fee deficiency with respect to this filing and any other fee required in connection with the present case, or credit any overpayment, to our Deposit Account No. 06-1135 under Order No. 7601/80981.

It is respectfully requested that the enclosed postcard be stamped with the date the enclosed documents are received by the PTO and that it be returned as soon as possible.

Very truly yours,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

A handwritten signature in black ink, reading "Michael A. Sanzo". The signature is written in a cursive, flowing style.

Michael A. Sanzo
Reg. No. 36,912
Attorney for Applicant

MAS:ct
Enclosures



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

re patent application of:

Rieping, Mechthild

Appl. No.: 10/784,902

Filed: February 24, 2004

For: **Process for the Preparation of
L-Amino Acids Using Strains of
the Enterobacteriaceae Family**

Art Unit: to be assigned

Examiner: to be assigned

Atty. Dkt.: 7601/80981

**Submission of Priority Document
in Accordance with the Requirements of Rule 55**

Commissioner of Patents
U.S. Patent and Trademark Office
2011 South Clark Place
Customer Window
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03
Arlington, VA 22202

Sir:

Please accept the enclosed certified copy of priority documents DE 10 2004 003 411.7, filed on January 23, 2004, for which benefit under 35 U.S.C. § 119/365 is being claimed in the above-captioned application. In the event priority to the enclosed foreign application has not been claimed, it is claimed hereby.

Respectfully submitted,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

By Michael A. Sanzo
Michael A. Sanzo
Reg. No. 36,912
Attorney for Applicant

Date March 11, 2004
1801 K Street, N.W., Suite 401L
Washington, DC 20006-1201
Phone: (202) 419-7013



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 10 2004 003 411.7

Anmeldetag: 23. Januar 2004

Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
40474 Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie
Enterobacteriaceae

IPC: C 12 N 1/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

ROMUS

**Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter
Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung
5 von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das malt-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, hergestellt werden.
15 Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der
20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und
30 L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie

Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht. Zusammenfassende Informationen zur Zell- und Molekularbiologie von

5 Escherichia coli und Salmonella sind in Neidhardt (ed): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2nd Edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, (1996) zu finden.

Das Maltose-System von Escherichia coli beinhaltet 10 Gene,

10 die die Aufnahme und den Stoffwechsel von Maltose und Maltodextrin regeln (Boos, W. and Shuman, H.A.; Microbiology and Molecular Biology Reviews 16: 204-229 (1998)). Diese Gene stehen unter der Kontrolle von MaltT, einem transkriptionalen Aktivator mit 901 Aminosäuren und

15 einer Größe von 103kDa. MaltT gehört zu einer Familie von bakteriellen Transaktivatoren, der MaltT oder LAL- Familie (Dannot. O.; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 435-440 (2001)). Gemeinsam ist Ihnen eine Größe von > 90 kDa, eine

20 ATP-Bindungs-Site im Bereich des N-Terminus und LuxR- Homologie im Bereich des C-Terminus. Die MaltT-Aktivität bedarf der Anwesenheit von ATP und Maltodextrin als Effektor (Raibaud, O. and Richet, E.; Journal of Bacteriology 169: 3059-3061 (1989) and Richet, E. and

25 Raibaud, O.; EMBO Reports 8: 981-987 (1989)). In der Zelle liegt MaltT nicht gebunden als Monomer vor und geht bei Anwesenheit von ATP und Maltotriose in die oligomere aktive Form über, was eine kooperative Bindung an Sequenzen der mal-Promotoren ermöglicht (Vidal-Ingigliardi et al.; The

30 Journal of Biological Chemistry 286: 24527-24530 (1993)).

Im Vergleich zu den positiven Effektoren sind drei Proteine bekannt, die die MaltT-Aktivität negativ beeinflussen können: MaltK als ATP-hydrolysierend Untereinheit des Maltodextrin Transport Systems (Hofnung et al.; Genetics 76: 169-184

35 (1974) und Reyes, M and Shuman H. A.; Journal of

Bacteriology 170: 4598-4602 (1988)). Null-Mutationen von malk führen zu einer konstitutiven Expression des Regulons, seine Überexpression jedoch zu kaum messbarer Expression. Ein zweiter Repressor des Maltose-Regulons ist maly.

- 5 Maly konkuriert mit Malt um die Bindung von Maltotrose, hemmt so die transkriptionale Aktivität und stabilisiert Malt in seiner inaktiven monomeren Form (Schreiber et al.; The Journal of Biological Chemistry 35: 765-776 (2000). Ein drittes, die Malt-Aktivität hemmendes Protein ist das Aes
- 10 Protein, ein Enzym welches Plasmid-kodiert mit eigenem Promotor die Expression der mal-Gene erniedrigt (Peist et al.; Journal of Bacteriology 161: 1201-1208 (1985).

Aufgabe der Erfindung

- Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue
- 15 Maßnahmen zur verbesserten Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter
- 20 Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen mindestens die für das malt-Gen kodierende Nukleotidsequenz oder dessen Allele verstärkt wird bzw. werden.
- 25 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-
- 30 Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene um mindestens eine (1) Kopie erhöht oder, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht. Als Ausgangs-Mikroorganismus wird der Mikroorganismus verstanden, an dem die erfinderischen Maßnahmen durchgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäuren produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man das malt-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele verstärkt, in einem Medium unter Bedingungen geeignet für die Bildung des malt-Genproduktes (transkriptionaler Aktivator de Maltose Regulons),
- b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in einer Menge von ≥ 0 bis

100% davon im Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.

- Die insbesondere rekombinanten Mikroorganismen, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind,
- 5 können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen
- 10 Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.
- 15 Rekombinante Mikroorganismen werden durch Transformation, Konjugation oder Transduktion mit die gewünschte Gene tragenden Vektoren hergestellt.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli

20 sind beispielsweise

- Escherichia coli H4581 (EP 0 301 572)
- Escherichia coli KY10935 (Bioscience
Biotechnology and Biochemistry 61(11):1877-1882 (1997))
- Escherichia coli VNIIGenetika MG442 (US-A-4278,765)
- 25 - Escherichia coli VNIIGenetika M1 (US-A-4,321,325)
- Escherichia coli VNIIGenetika 472T23 (US-A-5,631,157)
- Escherichia coli BKIIM B-3996 (US-A-5,175,107)
- Escherichia coli kat 13 (WO 98/04715)
- Escherichia coli KCCM-10132 (WO 00/09660)

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung *Serratia*, insbesondere der Art *Serratia marcescens* sind beispielsweise

- *Serratia marcescens* HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))
 - *Serratia marcescens* TLr156 (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))
 - *Serratia marcescens* T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992))
- 10 L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz
- 15 gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Cyclopentan-Carboxylsäure, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie
- 20 beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloge wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich
- 25 Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen Threonin-Raffinat, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-
- 30 Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der

Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der
feed back resistenten Form, Verstärkung der
Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthese,
Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed
5 back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-
Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-
Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form,
Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung
der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes,
10 Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-
Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und
Abschwächung der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae nach Verstärkung, insbesondere
15 Überexpression des malt-Gens, in verbesserter Weise L-
Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

Die Nukleotidsequenzen der Gene von *Escherichia coli*
gehören zum Stand der Technik (Siehe nachfolgende
Textstellen) und können ebenfalls der von Blattner et al.
20 (*Science* 277: 1453-1462 (1997)) publizierte Genomsequenz
von *Escherichia coli* entnommen werden.

Das malt-Gen wird unter anderem durch folgende Angaben
beschrieben:

25	Bezeichnung:	positiver transkriptionaler Aktivator des Maltose Regulons
	Funktion:	essentiell für Transkription der mal-Gene, wird induziert durch Maltotriose und ATP
30	Referenz:	Cole S.T. und Raibaud O.; <i>Gene</i> 42(2): 201- 208 (1986), Richet E. und Raibaud O.; <i>The EMBO Journal</i> 8(3): 981-987 (1989), Schreiber et al.; <i>Molecular Microbiology</i> 35(4): 765-776 (2001),

Schlegel et al.; The Journal
of Molecular Microbiology and
Biotechnology.; 4(3): 301-307 (2002)

Accession No: AE000418

- 5 Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des
National Center for Biotechnology Information (NCBI) der
National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der
Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies
Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge,
10 UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan)
entnommen werden.

Der besseren Übersichtlichkeit halber sind die
Nukleotidsequenz des malt-Gens und die Aminosäuresequenz
des Genproduktes von Escherichia coli als SEQ ID NO:3 und 4
15 wiedergegeben.

Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Gene
können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können
Allele der Gene verwendet werden, die sich aus der
Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch
20 funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“)
ergeben. Die Verwendung endogener Gene wird bevorzugt.

Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“
versteht man die in der Population einer Art vorhandenen
Gene oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

- 25 Zu den geeigneten Allelen des malt-Gens gehören solche,
welche funktionsneutrale Mutationen bzw. Sinnmutationen
(„sense mutations“) enthalten. Hierzu zählen unter anderem
solche, die zu mindestens einem (1) konservativen
Aminosäureaustausch in dem von ihnen kodierten Protein
30 führen. Die maximale Anzahl an konservativen
Aminosäureaustauschen kann 2, 3, 5, 10, 20, in keinem Fall
aber mehr als 30 Aminosäuren betreffen. Durch die genannten
konservativen Aminosäureaustausche wird die

Funktionsfähigkeit um 0% bis maximal 24%, 20%, 10%, 5%, 3%, 2% oder 1% erniedrigt oder erhöht.

- Bei den aromatischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den hydrophoben Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Leucin, Isoleucin und Valin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den polaren Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Glutamin und Asparagin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den basischen Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Arginin, Lysin und Histidin gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den sauren Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Asparaginsäure und Glutaminsäure gegeneinander ausgetauscht werden. Bei den Hydroxyl-Gruppen enthaltenden Aminosäuren spricht man von konservativen Austausch wenn Serin und Threonin gegeneinander ausgetauscht werden. Alle übrigen Aminosäureaustausche werden als nicht-konservative Aminosäurenaustausche bezeichnet.

- In gleicher Weise können auch solche Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für Varianten der genannten Proteine kodieren, die zusätzlich am N- oder C-Terminus eine Verlängerung oder Verkürzung um mindestens eine (1) Aminosäure enthalten. Diese Verlängerung oder Verkürzung beträgt nicht mehr als 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 oder 2 Aminosäuren oder Aminosäurereste.

- Zu den geeigneten Allelen zählen auch solche, die für Proteine kodieren, in denen mindestens eine (1) Aminosäure eingefügt (Insertion) oder entfernt (Deletion) ist. Die maximale Anzahl derartige als Indels bezeichneter Veränderungen kann 2, 3, 5, 10, 20 in keinem Falle aber mehr als 30 Aminosäuren betreffen.

Zu den geeigneten Allelen gehören ferner solche die durch Hybridisierung, insbesondere unter stringenten Bedingungen unter Verwendung von SEQ ID No. 3 oder Teilen davon insbesondere der Kodierregionen bzw. der dazu
5 komplementären Sequenzen, erhältlich sind.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim,
10 Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten
15 Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die
20 Hybridisierungsreaktion wird im Allgemeinen bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein
25 Puffer entsprechend 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter
30 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine
35 Temperatur von ca. 50°C - 68°C, ca. 52°C - 68°C, ca. 54°C -

68°C, ca. 56°C - 68°C, ca. 58°C - 68°C, ca. 60°C - 68°C,
ca. 62°C - 68°C, ca. 64°C - 68°C, ca. 66°C - 68°C
eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die
Salzkonzentration bis auf eine Konzentration entsprechend
5 0,2x SSC oder 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise
Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca.
1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente
isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder
mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% oder mindestens
10 80% oder mindestens 90% bis 95% oder mindestens 96% bis 99%
Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen.
Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form
sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von
der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,
15 Catalog No. 1603558).

Zur Erzielung einer Überexpression können beispielsweise
die Expression der Gene oder die katalytischen
Eigenschaften der Proteine erhöht werden. Gegebenenfalls
können beide Maßnahmen kombiniert werden.

20 So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden
Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und
Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die
sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert
werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die
25 stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch
induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die
Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-
Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung
der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression
30 verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus
des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt.
Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden
mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im
Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann
35 weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch

Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

- Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), bei de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), in 5 PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), bei Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) und in bekannten 10 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

- In Enterobacteriaceae replizierbare Plasmidvektoren wie z.B. von pACYC184 abgeleitete Kloniervektoren (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) oder pSC101-Derivate (Vocke und Bastia; 20 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21): 6557-6561 (1983)) können verwendet werden. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzen, wobei der Plasmidvektor mindestens eine für das malt-Gen kodierende 25 Nukleotidsequenz trägt.

Unter dem Begriff Transformation versteht man die Aufnahme einer isolierten Nukleinsäure durch einen Wirt (Mikroorganismus).

- Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, die die Expression 30 der jeweiligen Gene betreffen, durch Sequenzaustausch (Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Nähere Erläuterungen zu den Begriffen der Genetik und Molekularbiologie findet man in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4th ed., Springer Verlag, New York (USA), 2000) oder dem Lehrbuch von Berg, Tymoczko and Stryer (Biochemistry, 5th ed., Freeman and Company, New York (USA), 2002) oder dem Handbuch von Sambrook et al. (Molekular Cloning, A Laboratory Manual, (3-Volume Set), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001).

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Überexpression des malt-Gens, ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat oder Enzyme der Glykolyse oder PTS-Enzyme oder Enzyme des Schwefelstoffwechsels zu verstärken. Die Verwendung endogener Gene wird im allgemeinen bevorzugt.

So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 99/18228),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen ((WO 02/064808),

- die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
- das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB
5 (EP-A-0 994 190),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
- das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 01/92545),
- 10 • das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen (WO 03/004598),
- 15 • das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen (WO 03/004664),
- das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsH-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- 20 • das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsI-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- das für die Glucose-spezifische IIA Komponente des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende crr-Gen des ptsHIcrr-Operons (WO 03/004674),
- 25 • das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen (WO 03/004670),
- das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen (WO 03/004665),

- das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen (WO 03/038106),
- 5 • das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen (WO 03/038106),
- das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- 10 • das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen (WO 03/006666),
- 15 • das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen (WO 03/006666),
- das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- 20 • das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- 25 • das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),

- das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),
 - das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen des suc ABCD-Operons (WO 03/008615),
 - das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008615),
 - das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen (WO 03/076635),
 - 10 • das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen (WO 03/076635), und
 - das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997))
- 15 verstärkt werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des maltT-Gens, eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- 20 • das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- 25 • das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),

- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), (WO 02/29080),
- 5 • das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (WO 02/29080),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (WO 02/36797),
- 10 • das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (WO 02/081721), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist,
- das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (WO 02/081698), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist,
- 15 • das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen (WO 01/05939), das auch unter der Bezeichnung katF-Gen bekannt ist,
- das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen (WO 03/008603) und
- 20 abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder

25 mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das

30 entsprechende Enzym (Protein) oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-
5 Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Überexpression des malt-Gens, unerwünschte Nebenreaktionen
10 auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im
15 batch - Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die
20 Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise
25 den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

30 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und

Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 5 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
- 10 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden.

- 15 Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden.
- 20 Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- 25 Die Fermentation wird im allgemeinen bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,0, insbesondere 6,0 bis 8,0, durchgeführt. Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure
- 30 oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika
- 35 hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen

aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch
10 Anionenaustauschchromatographie mit anschließender
Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958))
beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC
erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry
15 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie beispielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

20 Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Verwendete Minimal- (M9) und Vollmedien (LB) für Escherichia coli sind von J.H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Ligation, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung werden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation von Escherichia coli wird, wenn nicht anders beschrieben, nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2172-2175 (1989)) durchgeführt.

Die Bebrütungstemperatur bei der Herstellung von Stämmen und Transformanten ist 37°C.

Beispiel 1

Konstruktion des Expressionsplasmides pTrc99AmalT

- 5 Das malt-Gen aus E. coli K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz des malt-Gens in E. coli K12 MG1655 (Accession Number AE000418, Blattner et al. (Science 277: 10 1453-1474 (1997)) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland). Die Primer enthalten Sequenzen für Restriktionsenzyme, die in der unten dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstreichen markiert sind. Der Primer malt1 enthält die 15 Restriktionsschnittstelle für XbaI, der Primer malt2 die für HindIII.

malt1:

5' -CCTCATTCTAGACAGTGAAGTGATTAA-3' (SEQ ID No. 1)

malt2:

- 20 5' -GGCGCGTTATCAAGCTTAAGTTACAC- 3' (SEQ ID No. 2)

- Die für die PCR eingesetzte chromosomale E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 2755 bp großes DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern 25 unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit der Vent-DNA-Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) amplifiziert werden (SEQ ID No. 3).

- 30 Das amplifizierte malt-Fragment wird mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI restringiert und nach Aufreinigung (Purification Kit, QIAGEN, Hilden,

- Deutschland) in einem 0,8%igen Agarosegel überprüft. Der Vektor pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) wird mit den Enzymen HindIII und XbaI gespalten, und mit dem restringierten malT-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm
- 5 TOP10 One Shot® (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) wird mit dem Ligationsansatz transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung kann nach der Plasmid DNA
- 10 Isolierung durch die Kontrollspaltung mit dem Enzymen EcoRV und PstI nachgewiesen werden. Das Plasmid wird als pTrc99AmalT (Figur 1) bezeichnet.

Beispiel 2

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442/pTrc99AmalT

- 15 Der L-Threonin produzierende E. coli Stamm MG442 ist in der Patentschrift US-A- 4,278,765 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) als CMIM B-1628 hinterlegt.
- 20 Der Stamm MG442 wird mit dem in Beispiel 1 beschriebenen Expressionsplasmid pTrc99AmalT und mit dem Vektor pTrc99A transformiert und auf LB Agar mit 50 µg/ml Ampicillin Plasmid tragende Zellen selektioniert. Die erfolgreichen Transformationen können nach der Plasmid DNA Isolierung
- 25 durch die Kontrollspaltungen mit den Enzymen HpaI, HindIII/XbaI und EcoRV bestätigt werden. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442/pTrc99AmalT und MG442/pTrc99A. Ausgewählte Einzelkolonien werden anschließend auf Minimalmedium mit der folgenden Zusammensetzung: 3,5 g/l
- 30 Na₂HPO₄*2H₂O, 1,5 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,1 g/l MgSO₄*7H₂O, 2 g/l Glucose, 20 g/l Agar, 50 mg/l Ampicillin, weiter vermehrt. Die Bildung von L-Threonin wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium

- der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose, 50 mg/l Ampicillin, beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert.

- Je 250 µl dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 30 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose, 50 mg/l Ampicillin) überimpft und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Induktion der Expression des malt-Gens wird in Parallelansätzen 100 mg/l Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) hinzugefügt. Die Bildung von L-Threonin durch den Ausgangsstamm MG442 wird in der gleichen Weise überprüft, wobei jedoch keine Zugabe von Ampicillin zum Medium erfolgt. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Düsseldorf, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.
- Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Threonin im steril filtrierte Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.
- In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	Zusätze	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	-	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	-	3,8	1,3
MG442/pTrc99AmalT	-	5,9	2,1
MG442/pTrc99AmalT	IPTG	7,2	2,4

Kurze Beschreibung der Figur:

Figur 1: Karte des das malt-Gen enthaltenden Plasmides
pTrc99AmalT

Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- Amp: Ampicillinresistenzgen
- lacI: Gen für das Repressorprotein des trc-Promotors
- Ptrc: trc-Promotorregion, IPTG-induzierbar
- malt: Kodierregion des malt-Gens
- 5S: 5S rRNA-Region
- rrnBT: rRNA-Terminator-Region

Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben folgende Bedeutung

- EcoRV: Restriktionsendonuklease aus Escherichia coli B945

- HindIII: Restriktionsendonuklease aus Haemophilus influenzae R_c
- HpaI: Restriktionsendonuklease aus Haemophilus parainfluenzae
- 5 • PvuI: Restriktionsendonuklease aus Paracoccus alcaliphilus
- XbaI: Restriktionsendonuklease aus Xanthomonas campestris

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Threonin, dadurch gekennzeichnet, dass
man folgende Schritte durchführt:
 - 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae, in denen man das malt-Gen oder
dafür kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele
verstärkt, in einem Medium unter Bedingungen
10 geeignet für die Bildung des malt-Genproduktes,
 - b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium
oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
 - c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure wobei
gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe
15 und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder
Anteilen (≥ 0 bis 100%) davon im Produkt
verbleiben.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen man
20 zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der
gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
25 sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure
verringern.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man die Expression des (der) Polynukleotids (e),
das (die) für das malt-Gen kodiert (kodieren), erhöht.
- 30 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man die regulatorischen und/oder katalytischen

Eigenschaften des Polypeptids (Proteins) verbessert oder erhöht, für das das Polynukleotid malt kodiert.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren
- 5 Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 6.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die
- 10 Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,
- 6.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
- 6.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,
- 15 6.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,
- 6.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,
- 6.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
- 20 6.7 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,
- 6.8 das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen,
- 6.9 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen,
- 25 6.10 das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen,
- 6.11 das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen,

- 6.12 das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,
- 6.13 das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems kodierende ptsI-Gen,
- 5 6.14 das für die Glucose-spezifische IIA Komponente kodierende crr-Gen,
- 6.15 das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen,
- 10 6.16 das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen,
- 6.17 das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen,
- 6.18 das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen,
- 15 6.19 das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen,
- 6.20 das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen,
- 20 6.21 das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen,
- 6.22 das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen,
- 6.23 das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen,
- 25 6.24 das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen,
- 6.25 das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen,

- 6.26 das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen,
- 6.27 das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen
- 5 6.28 das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,
- 6.29 das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen,
- 10 6.30 das für die β -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen,
- 6.31 das für die α -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen,
- 15 6.32 das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen,
- 6.33 das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen, und
- 20 6.34 das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen

verstärkt.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:
- 25 7.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,

- 7.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,
- 7.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfA,
- 5 7.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,
- 7.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,
- 10 7.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,
- 7.7 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,
- 7.8 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
- 15 7.9 das für den Sigma³⁸-Faktor kodierende rpoS-Gen und,
- 7.10 das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen

20 abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

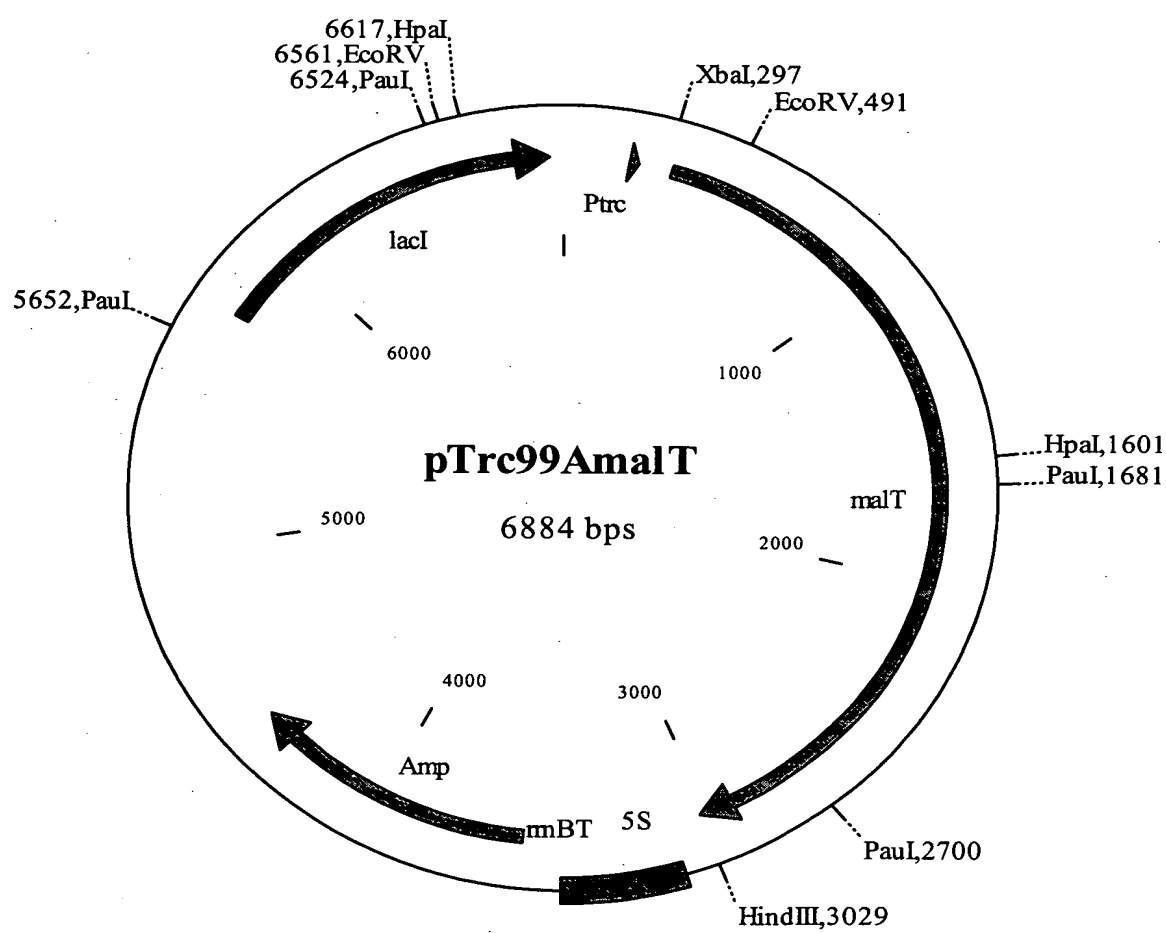
8. Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der Gattung Escherichia, in denen das malt-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt vorliegt.
- 25 9. Mikroorganismen, gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass diese L-Threonin produzieren.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, in dem man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man das maltT-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen oder Allele verstärkt,
- 10 b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen, und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure.

Figur 1: Karte des Plasmides pTrc99AmalT



SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Degussa AG

<120> Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von
10 Stämmen der Familie Enterobacteriaceae

<130> 020487 BT

15 <160> 4

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

25 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(28)
30 <223> malT1

<400> 1
35 cctcattcta gacagtgaag tgattaac 28

<210> 2
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<221> Primer
<222> (1)..(26)
45 <223> malT2

<400> 2
50 ggcgcggttat caagcttaac ttacac 26

<210> 3
<211> 2755
<212> DNA
<213> Echerichia coli

55 <220>
<221> PCR-Produkt
<222> (1)..(2755)
60 <223>

<220>
<221> CDS

<222> (30)..(2735)

<223> malT-Gen

5 <400> 3
 cctcattcta gacagtgaag tgattaact atg ctg att ccg tca aaa cta agt 53
 Met Leu Ile Pro Ser Lys Leu Ser
 1 5

10 cgt ccg gtt cga ctc gac cat acc gtg gtt cgt gag cgc ctg ctg gct 101
 Arg Pro Val Arg Leu Asp His Thr Val Val Arg Glu Arg Leu Leu Ala
 10 15 20

15 aaa ctt tcc ggc gcg aac aac ttc cgg ctg gcg ctg atc acg agt cct 149
 Lys Leu Ser Gly Ala Asn Asn Phe Arg Leu Ala Leu Ile Thr Ser Pro
 25 30 35 40

20 gcg ggc tac gga aag acc acc ctc att tcc cag tgg gcg gca ggc aaa 197
 Ala Gly Tyr Gly Lys Thr Thr Leu Ile Ser Gln Trp Ala Ala Gly Lys
 45 50 55

25 aac gat atc ggc tgg tac tcg ctg gat gaa ggt gat aac cag caa gag 245
 Asn Asp Ile Gly Trp Tyr Ser Leu Asp Glu Gly Asp Asn Gln Gln Glu
 60 65 70

30 cgt ttc gcc agc tat ctc att gcc gcc gtg cag cag gca acc aac ggt 293
 Arg Phe Ala Ser Tyr Leu Ile Ala Ala Val Gln Gln Ala Thr Asn Gly
 75 80 85

35 cac tgt gcg ata tgt gag acg atg gcg caa aaa cgg caa tat gcc agc 341
 His Cys Ala Ile Cys Glu Thr Met Ala Gln Lys Arg Gln Tyr Ala Ser
 90 95 100

40 ctg acg tca ctc ttc gcc cag ctt ttc att gag ctg gcg gaa tgg cat 389
 Leu Thr Ser Leu Phe Ala Gln Leu Phe Ile Glu Leu Ala Glu Trp His
 105 110 115 120

45 agc cca ctt tat ctg gtc atc gat gac tat cat ctg atc act aat cca 437
 Ser Pro Leu Tyr Leu Val Ile Asp Asp Tyr His Leu Ile Thr Asn Pro
 125 130 135

50 gtg atc cac gag tca atg cgc ttc ttt att cgc cat caa cca gaa aat 485
 Val Ile His Glu Ser Met Arg Phe Phe Ile Arg His Gln Pro Glu Asn
 140 145 150

55 ctc acc ctg gtg gtg ttg tca cgc aac ctt ccg caa ctg ggc att gcc 533
 Leu Thr Leu Val Val Leu Ser Arg Asn Leu Pro Gln Leu Gly Ile Ala
 155 160 165

60 aat ctg cgt gtt cgt gat caa ctg ctg gaa att ggc agt cag caa ctg 581
 Asn Leu Arg Val Arg Asp Gln Leu Leu Glu Ile Gly Ser Gln Gln Leu
 170 175 180

65 gca ttt acc cat cag gaa gcg aag cag ttt ttt gat tgc cgt ctg tca 629
 Ala Phe Thr His Gln Glu Ala Lys Gln Phe Phe Asp Cys Arg Leu Ser
 185 190 195 200

70 tcg ccg att gaa gcc gca gaa agc agt cgg att tgc gat gac gtt tcc 677
 Ser Pro Ile Glu Ala Ala Glu Ser Ser Arg Ile Cys Asp Asp Val Ser
 205 210 215

75 ggt tgg gcg acg gca cta cag cta atc gcc ctc tcc gcc cgg cag aat 725
 Gly Trp Ala Thr Ala Leu Gln Leu Ile Ala Leu Ser Ala Arg Gln Asn
 220 225 230

	acc cac tca gcc cat aag tcg gca cgc cgc ctg gcg gga atc aat gcc	773
	Thr His Ser Ala His Lys Ser Ala Arg Arg Leu Ala Gly Ile Asn Ala	
	235 240 245	
5	agc cat ctt tcg gat tat ctg gtc gat gag gtt ttg gat aac gtc gat	821
	Ser His Leu Ser Asp Tyr Leu Val Asp Glu Val Leu Asp Asn Val Asp	
	250 255 260	
10	ctc gca acg cgc cat ttt ctg ttg aaa agc gcc att ttg cgc tca atg	869
	Leu Ala Thr Arg His Phe Leu Leu Lys Ser Ala Ile Leu Arg Ser Met	
	265 270 275 280	
15	aac gat gcc ctc atc acc cgt gtg acc ggc gaa gaa aac ggg caa atg	917
	Asn Asp Ala Leu Ile Thr Arg Val Thr Gly Glu Glu Asn Gly Gln Met	
	285 290 295	
20	cgc ctc gaa gag att gag cgt cag ggg ctg ttt tta cag cgg atg gat	965
	Arg Leu Glu Glu Ile Glu Arg Gln Gly Leu Phe Leu Gln Arg Met Asp	
	300 305 310	
25	gat acc ggc gag tgg ttc tgc tat cac ccg ctg ttt ggt aac ttc ctg	1013
	Asp Thr Gly Glu Trp Phe Cys Tyr His Pro Leu Phe Gly Asn Phe Leu	
	315 320 325	
30	cgc cag cgc tgc cag tgg gaa ctg gcg gcg gag ctg ccg gaa atc cac	1061
	Arg Gln Arg Cys Gln Trp Glu Leu Ala Ala Glu Leu Pro Glu Ile His	
	330 335 340	
35	cgt gcc gcc gca gaa agc tgg atg gcc cag gga ttt ccc agc gaa gca	1109
	Arg Ala Ala Ala Glu Ser Trp Met Ala Gln Gly Phe Pro Ser Glu Ala	
	345 350 355 360	
40	att cat cat gcg ctg gcg gca ggc gat gcg ctg atg ctg cgc gat att	1157
	Ile His His Ala Leu Ala Ala Gly Asp Ala Leu Met Leu Arg Asp Ile	
	365 370 375	
45	ctg ctt aat cac gcc tgg agt ctg ttc aac cat agc gaa ctg tcg ctg	1205
	Leu Leu Asn His Ala Trp Ser Leu Phe Asn His Ser Glu Leu Ser Leu	
	380 385 390	
50	ctg gaa gag tcg ctt aag gcc ctg ccg tgg gac agc ttg ctg gaa aat	1253
	Leu Glu Glu Ser Leu Lys Ala Leu Pro Trp Asp Ser Leu Glu Asn	
	395 400 405	
55	ccg cag ttg gtg tta ttg cag gcg tgg ctg atg caa agc caa cat cgc	1301
	Pro Gln Leu Val Leu Leu Gln Ala Trp Leu Met Gln Ser Gln His Arg	
	410 415 420	
60	tac ggc gaa gtt aac acc ctg cta gcc cgt gct gaa cat gaa atc aag	1349
	Tyr Gly Glu Val Asn Thr Leu Leu Ala Arg Ala Glu His Glu Ile Lys	
	425 430 435 440	
65	gac atc aga gaa gac acc atg cac gca gaa ttt aac gct ctg cgc gcc	1397
	Asp Ile Arg Glu Asp Thr Met His Ala Glu Phe Asn Ala Leu Arg Ala	
	445 450 455	
70	cag gtg gcg att aac gat ggt aat ccg gat gaa gcg gaa cgg ctg gca	1445
	Gln Val Ala Ile Asn Asp Gly Asn Pro Asp Glu Ala Glu Arg Leu Ala	
	460 465 470	
75	aaa ctg gca ctg gaa gag ctg ccg ccg ggc tgg ttc tat agc cgc att	1493
	Lys Leu Ala Leu Glu Glu Leu Pro Pro Gly Trp Phe Tyr Ser Arg Ile	
	475 480 485	

	gtg gca acc tcg gtg ctg ggt gaa gtg ctg cac tgc aaa ggc gaa ttg	1541
	Val Ala Thr Ser Val Leu Gly Glu Val Leu His Cys Lys Gly Glu Leu	
5	490 495 500	
	acc cgc tca ctg gcg cta atg cag caa acc gaa cag atg gca cgc cag	1589
	Thr Arg Ser Leu Ala Leu Met Gln Gln Thr Glu Gln Met Ala Arg Gln	
	505 510 515 520	
10	cac gat gtc tgg cac tac gct ttg tgg agt tta atc cag caa agt gaa	1637
	His Asp Val Trp His Tyr Ala Leu Trp Ser Leu Ile Gln Gln Ser Glu	
	525 530 535	
15	att ctg ttt gcc caa ggg ttc ctg caa acc gcg tgg gaa acg cag gaa	1685
	Ile Leu Phe Ala Gln Gly Phe Leu Gln Thr Ala Trp Glu Thr Gln Glu	
	540 545 550	
20	aaa gca ttc cag ctg atc aac gag cag cat ctg gaa cag ctg cca atg	1733
	Lys Ala Phe Gln Leu Ile Asn Glu Gln His Leu Glu Gln Leu Pro Met	
	555 560 565	
25	cat gag ttt ctg gtg cgc att cgt gcg cag ctg tta tgg gcc tgg gcg	1781
	His Glu Phe Leu Val Arg Ile Arg Ala Gln Leu Leu Trp Ala Trp Ala	
	570 575 580	
30	cgg ctg gat gaa gcc gaa gcg tcg gcg cgt agc ggg att gaa gtc ttg	1829
	Arg Leu Asp Glu Ala Ala Ser Ala Arg Ser Gly Ile Glu Val Leu	
	585 590 595 600	
35	tcg tct tat cag cca cag caa cag ctt cag tgc ctg gca atg ttg att	1877
	Ser Ser Tyr Gln Pro Gln Gln Gln Leu Gln Cys Leu Ala Met Leu Ile	
	605 610 615	
40	caa tgc tcg ctg gcc cgt ggt gat tta gat aac gcc cgt agc cag ctg	1925
	Gln Cys Ser Leu Ala Arg Gly Asp Leu Asp Asn Ala Arg Ser Gln Leu	
	620 625 630	
45	aac cgt ctg gaa aac ctg ctg ggg aat ggc aaa tat cac agc gac tgg	1973
	Asn Arg Leu Glu Asn Leu Leu Gly Asn Gly Lys Tyr His Ser Asp Trp	
	635 640 645	
50	atc tct aac gcc aac aaa gtc cgg gtg att tac tgg caa atg acc ggc	2021
	Ile Ser Asn Ala Asn Lys Val Arg Val Ile Tyr Trp Gln Met Thr Gly	
	650 655 660	
55	gat aaa gcc gcc gct gcc aac tgg ttg cgt cat acg gct aaa cca gag	2069
	Asp Lys Ala Ala Ala Ala Asn Trp Leu Arg His Thr Ala Lys Pro Glu	
	665 670 675 680	
60	ttt gcg aac aac cac ttc ctg caa ggt caa tgg cgc aac att gcc cgt	2117
	Phe Ala Asn Asn His Phe Leu Gln Gly Gln Trp Arg Asn Ile Ala Arg	
	685 690 695	
65	gca caa atc ttg ctg ggc gag ttt gaa ccg gca gaa att gtt ctc gaa	2165
	Ala Gln Ile Leu Leu Gly Glu Phe Glu Pro Ala Glu Ile Val Leu Glu	
	700 705 710	
70	gaa ctc aat gaa aat gcc cgg agt ctg cgg ttg atg agc gat ctc aac	2213
	Glu Leu Asn Glu Asn Ala Arg Ser Leu Arg Leu Met Ser Asp Leu Asn	
	715 720 725	
75	cgt aac ctg ttg ctg ctt aat caa ctg tac tgg cag gcc gga cgt aaa	2261
	Arg Asn Leu Leu Leu Leu Asn Gln Leu Tyr Trp Gln Ala Gly Arg Lys	
	730 735 740	

5 agt gac gcc cag cgc gtg ttg ctg gac gca tta aaa ctg gcg aat cgc 2309
 Ser Asp Ala Gln Arg Val Leu Leu Asp Ala Leu Lys Leu Ala Asn Arg 760
 745 750 755
 acc gga ttt atc agc cat ttt gtc atc gaa ggc gaa gcg atg gcg caa 2357
 Thr Gly Phe Ile Ser His Phe Val Ile Glu Gly Glu Ala Met Ala Gln 775
 765 770
 10 caa ctg cgt cag ctg att cag ctt aat acg ctg ccg gaa ctg gaa cag 2405
 Gln Leu Arg Gln Leu Ile Gln Leu Asn Thr Leu Pro Glu Leu Glu Gln 790
 780 785
 15 cat cgc gcg cag cgt att ctg cga gaa atc aat caa cat cat cgg cat 2453
 His Arg Ala Gln Arg Ile Leu Arg Glu Ile Asn Gln His His Arg His 805
 795 800
 20 aaa ttc gcc cat ttc gat gag aat ttc gtt gaa cgt ctg cta aat cat 2501
 Lys Phe Ala His Phe Asp Glu Asn Phe Val Glu Arg Leu Leu Asn His 820
 810 815
 cct gaa gta cct gaa ctg atc cgc acc agc ccg ctg acg caa cgt gaa 2549
 Pro Glu Val Pro Glu Leu Ile Arg Thr Ser Pro Leu Thr Gln Arg Glu 840
 825 830 835
 25 tgg cag gta ctg ggg ctg atc tac tct ggt tac agc aat gag caa att 2597
 Trp Gln Val Leu Glu Leu Ile Tyr Ser Gly Tyr Ser Asn Glu Gln Ile 855
 845 850
 30 gcc gga gaa ctg gaa gtc gcg gca acc acc atc aaa acg cat atc cgc 2645
 Ala Gly Glu Leu Glu Val Ala Ala Thr Thr Ile Lys Thr His Ile Arg 870
 860 865
 35 aat ctg tat cag aaa ctc ggc gtg gcc cat cgc cag gat gcg gta caa 2693
 Asn Leu Tyr Gln Lys Leu Gly Val Ala His Arg Gln Asp Ala Val Gln 885
 875 880
 40 cac gcc cag caa ttg ctg aag atg atg ggg tac ggc gtg taa 2735
 His Ala Gln Gln Leu Leu Lys Met Met Gly Tyr Gly Val 900
 890 895
 gttaagcttg ataacgcgcc 2755
 45 <210> 4
 <211> 901
 <212> PRT
 <213> Echerichia coli
 50 <400> 4
 Met Leu Ile Pro Ser Lys Leu Ser Arg Pro Val Arg Leu Asp His Thr
 1 5 10 15
 55 Val Val Arg Glu Arg Leu Leu Ala Lys Leu Ser Gly Ala Asn Asn Phe
 20 25 30
 Arg Leu Ala Leu Ile Thr Ser Pro Ala Gly Tyr Gly Lys Thr Thr Leu
 35 40 45
 60 Ile Ser Gln Trp Ala Ala Gly Lys Asn Asp Ile Gly Trp Tyr Ser Leu
 50 55 60
 65 Asp Glu Gly Asp Asn Gln Gln Glu Arg Phe Ala Ser Tyr Leu Ile Ala
 65 70 75 80

	Ala	Val	Gln	Gln	Ala	Thr	Asn	Gly	His	Cys	Ala	Ile	Cys	Glu	Thr	Met	
					85					90					95		
5	Ala	Gln	Lys	Arg	Gln	Tyr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ser	Leu	Phe	Ala	Gln	Leu	
				100					105					110			
	Phe	Ile	Glu	Leu	Ala	Glu	Trp	His	Ser	Pro	Leu	Tyr	Leu	Val	Ile	Asp	
			115					120					125				
10	Asp	Tyr	His	Leu	Ile	Thr	Asn	Pro	Val	Ile	His	Glu	Ser	Met	Arg	Phe	
		130					135					140					
	Phe	Ile	Arg	His	Gln	Pro	Glu	Asn	Leu	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Ser	Arg	
	145					150					155					160	
15	Asn	Leu	Pro	Gln	Leu	Gly	Ile	Ala	Asn	Leu	Arg	Val	Arg	Asp	Gln	Leu	
				165					170						175		
20	Leu	Glu	Ile	Gly	Ser	Gln	Gln	Leu	Ala	Phe	Thr	His	Gln	Glu	Ala	Lys	
				180					185					190			
	Gln	Phe	Phe	Asp	Cys	Arg	Leu	Ser	Ser	Pro	Ile	Glu	Ala	Ala	Glu	Ser	
			195					200					205				
25	Ser	Arg	Ile	Cys	Asp	Asp	Val	Ser	Gly	Trp	Ala	Thr	Ala	Leu	Gln	Leu	
		210					215					220					
	Ile	Ala	Leu	Ser	Ala	Arg	Gln	Asn	Thr	His	Ser	Ala	His	Lys	Ser	Ala	
	225					230					235					240	
30	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	Ile	Asn	Ala	Ser	His	Leu	Ser	Asp	Tyr	Leu	Val	
				245						250					255		
35	Asp	Glu	Val	Leu	Asp	Asn	Val	Asp	Leu	Ala	Thr	Arg	His	Phe	Leu	Leu	
			260						265					270			
	Lys	Ser	Ala	Ile	Leu	Arg	Ser	Met	Asn	Asp	Ala	Leu	Ile	Thr	Arg	Val	
			275					280					285				
40	Thr	Gly	Glu	Glu	Asn	Gly	Gln	Met	Arg	Leu	Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Gln	
		290				295						300					
	Gly	Leu	Phe	Leu	Gln	Arg	Met	Asp	Asp	Thr	Gly	Glu	Trp	Phe	Cys	Tyr	
	305				310						315					320	
45	His	Pro	Leu	Phe	Gly	Asn	Phe	Leu	Arg	Gln	Arg	Cys	Gln	Trp	Glu	Leu	
				325						330					335		
50	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	Ile	His	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Ser	Trp	Met	
				340					345					350			
	Ala	Gln	Gly	Phe	Pro	Ser	Glu	Ala	Ile	His	His	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	
			355					360					365				
55	Asp	Ala	Leu	Met	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Leu	Asn	His	Ala	Trp	Ser	Leu	
		370					375					380					
	Phe	Asn	His	Ser	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Lys	Ala	Leu	
	385					390					395					400	
60	Pro	Trp	Asp	Ser	Leu	Leu	Glu	Asn	Pro	Gln	Leu	Val	Leu	Leu	Gln	Ala	
				405						410					415		
65	Trp	Leu	Met	Gln	Ser	Gln	His	Arg	Tyr	Gly	Glu	Val	Asn	Thr	Leu	Leu	
			420						425					430			

Ala Arg Ala Glu His Glu Ile Lys Asp Ile Arg Glu Asp Thr Met His
 435 440 445
 5
 Ala Glu Phe Asn Ala Leu Arg Ala Gln Val Ala Ile Asn Asp Gly Asn
 450 455 460
 10 Pro Asp Glu Ala Glu Arg Leu Ala Lys Leu Ala Leu Glu Glu Leu Pro
 465 470 475 480
 Pro Gly Trp Phe Tyr Ser Arg Ile Val Ala Thr Ser Val Leu Gly Glu
 485 490 495
 15 Val Leu His Cys Lys Gly Glu Leu Thr Arg Ser Leu Ala Leu Met Gln
 500 505 510
 Gln Thr Glu Gln Met Ala Arg Gln His Asp Val Trp His Tyr Ala Leu
 515 520 525
 20 Trp Ser Leu Ile Gln Gln Ser Glu Ile Leu Phe Ala Gln Gly Phe Leu
 530 535 540
 25 Gln Thr Ala Trp Glu Thr Gln Glu Lys Ala Phe Gln Leu Ile Asn Glu
 545 550 555 560
 Gln His Leu Glu Gln Leu Pro Met His Glu Phe Leu Val Arg Ile Arg
 565 570 575
 30 Ala Gln Leu Leu Trp Ala Trp Ala Arg Leu Asp Glu Ala Glu Ala Ser
 580 585 590
 Ala Arg Ser Gly Ile Glu Val Leu Ser Ser Tyr Gln Pro Gln Gln Gln
 595 600 605
 35 Leu Gln Cys Leu Ala Met Leu Ile Gln Cys Ser Leu Ala Arg Gly Asp
 610 615 620
 40 Leu Asp Asn Ala Arg Ser Gln Leu Asn Arg Leu Glu Asn Leu Leu Gly
 625 630 635 640
 Asn Gly Lys Tyr His Ser Asp Trp Ile Ser Asn Ala Asn Lys Val Arg
 645 650 655
 45 Val Ile Tyr Trp Gln Met Thr Gly Asp Lys Ala Ala Ala Ala Asn Trp
 660 665 670
 Leu Arg His Thr Ala Lys Pro Glu Phe Ala Asn Asn His Phe Leu Gln
 675 680 685
 50 Gly Gln Trp Arg Asn Ile Ala Arg Ala Gln Ile Leu Leu Gly Glu Phe
 690 695 700
 55 Glu Pro Ala Glu Ile Val Leu Glu Glu Leu Asn Glu Asn Ala Arg Ser
 705 710 715 720
 Leu Arg Leu Met Ser Asp Leu Asn Arg Asn Leu Leu Leu Leu Asn Gln
 725 730 735
 60 Leu Tyr Trp Gln Ala Gly Arg Lys Ser Asp Ala Gln Arg Val Leu Leu
 740 745 750
 Asp Ala Leu Lys Leu Ala Asn Arg Thr Gly Phe Ile Ser His Phe Val
 755 760 765
 65

Ile Glu Gly Glu Ala Met Ala Gln Gln Leu Arg Gln Leu Ile Gln Leu
 770 775 780
 5 Asn Thr Leu Pro Glu Leu Glu Gln His Arg Ala Gln Arg Ile Leu Arg
 785 790 795 800
 Glu Ile Asn Gln His His Arg His Lys Phe Ala His Phe Asp Glu Asn
 805 810 815
 10 Phe Val Glu Arg Leu Leu Asn His Pro Glu Val Pro Glu Leu Ile Arg
 820 825 830
 Thr Ser Pro Leu Thr Gln Arg Glu Trp Gln Val Leu Gly Leu Ile Tyr
 835 840 845
 15 Ser Gly Tyr Ser Asn Glu Gln Ile Ala Gly Glu Leu Glu Val Ala Ala
 850 855 860
 20 Thr Thr Ile Lys Thr His Ile Arg Asn Leu Tyr Gln Lys Leu Gly Val
 865 870 875 880
 Ala His Arg Gln Asp Ala Val Gln His Ala Gln Gln Leu Leu Lys Met
 885 890 895
 25 Met Gly Tyr Gly Val
 900